



TITLE:

Functionalization of ribonucleopeptide receptors for sensing and catalytic activities(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Tamura, Tomoki

CITATION:

Tamura, Tomoki. Functionalization of ribonucleopeptide receptors for sensing and catalytic activities. 京都大学, 2017, 博士(エネルギー科学)

ISSUE DATE:

2017-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k20482>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により要約は2018-03-31に公開; 許諾条件により要旨は2018-03-31に公開

(続紙 1)

京都大学	博士 (エネルギー科学)	氏名	田村 友樹
論文題目	Functionalization of ribonucleopeptide receptors for sensing and catalytic activities (リボヌクレオペプチドリセプターに対するセンシング能や触媒活性の付与)		
(論文内容の要旨)			
<p>本論文は、リボヌクレオペプチド (RNP) を基本骨格とするリセプターを利用して蛍光センサーや触媒活性をもつ RNP を目的に応じて効率的に作製するために、多様な RNP ライブラリーを簡便に作製する方法論を構築し、その中から特定の機能をもつ RNP をスクリーニングによって選択する評価法の構築、また、構造情報をもとにして機能性 RNP を作製する方法について論じた結果をまとめたものであり、全 7 章からなっている。</p> <p>第 1 章は序論であり、生物のエネルギー利用システムを支えている、生体高分子リセプターがもつ高い基質選択性を利用した機能性分子作製方法論を開発することで、高効率な物質変換システムが構築できる可能性を論じている。その実現には、生体高分子リセプターの機能を保持しながら、新しい機能ユニットを用いて新しい機能を付与導入する一般的な方法論の確立が重要であるとし、リセプターの高い基質認識能と蛍光性や触媒活性などの機能を併せ持った高機能な分子を獲得するためうえでの、合理的に作製した分子ライブラリー作製方法論の必要性必要性について論じている。さらに、機能性分子を作製するための基本骨格としての RNP 複合体の有用性に言及し、これまでに確立されている Rev ペプチド-RRE RNA 複合体を用いた段階的機能化法をさらに拡張することで、狙い通りの機能を持った機能性 RNP を作製する方法論の開発が可能であると結論づけている。</p> <p>第 2 章では、段階的機能化法を利用し、RNP リセプターを標的分子をレシオ検出可能な蛍光 RNP センサーへと機能化することに成功した。レシオメトリック型の蛍光センサーは、定量性に優れるため、微小な濃度変化の検出に優れていることが知られている。テトラサイクリン結合性 RNP リセプターとドーパミン結合性 RNP リセプターを用いて、レシオメトリック型蛍光分子である SNARF を導入した Rev ペプチドとの RNP 複合体を形成させることで、それぞれ、もとのリセプターの基質認識能を保持したまま、定量性の高いレシオ検出が可能な蛍光 RNP センサーを構築することに成功した。</p> <p>第 3 章では、化学反応性蛍光分子ライブラリーを用いて、それらの蛍光分子を Rev ペプチドで修飾したライブラリーを簡便に作製する方法論を開発した。この蛍光分子修飾 Rev ペプチドライブラリーを既存の ATP 結合性 RNP リセプターの RNA サブユニットと複合体形成させて、蛍光分子修飾 RNP ライブラリーを構築した。このライブラリーを、標的分子の添加前後での蛍光強度変化比を指標としてスクリーニングすることにより、高い ATP センシング能をもつ蛍光 RNP センサーを獲得することに成功した。</p>			

第4章では、RNPのRNAサブユニットが形成する基質結合場とペプチドサブユニットに修飾した触媒分子とが多様な空間配置をとる、構造多様性に富んだRNPライブラリーの作製に成功した。DMAPなどの触媒能を有する分子を、多様な構造のリンカーを介してRevペプチドに導入したRevペプチドライブラリーと、*in vitro* セレクションで獲得したATP結合性RNAサブユニットライブラリーとの複合体形成によって、構造多様性に富んだ触媒分子修飾RNPリセプター群を簡便に作製する方法を確立した。

第5章では、第4章で構築したRNPライブラリーを用いて、触媒活性を指標としたスクリーニングをおこない、エステル加水分解活性をもつRNPの獲得に成功した。加水分解に伴って蛍光強度が増大するウンベリフェロンエステルの特性を利用した検出ができるウンベリフェリルアデノシン（Umb-Ado）を合成し、多数のRNPの触媒活性を同時に評価できるスクリーニングシステムの構築に成功した。

第6章では、三次元構造が既知のRNAアプタマーとthree way junctionを形成するRNA構造モチーフを利用して、構造情報を利用したモジュール型設計による触媒分子修飾RNPの作製を試みした。Revペプチドに修飾導入した触媒分子と、ATPアプタマーの基質結合場が空間的に近接するように分子設計したRNPを6種類作製し、第5章で合成したUmb-Adoを用いて、それらのエステル加水分解活性を評価した。これにより、構造情報を利用した触媒分子修飾RNPの設計指針を示した。

第7章は論文の総括である。

以上、本論文では、RNPの段階的機能化によってリセプターに新しい機能を付与することで、蛍光センサーならびに触媒活性を有するリセプターを合理的に作製する方法論を開発した。その成果としてRNPリセプターの基質認識能を活かした基質を定量的に検出できる蛍光センサーの構築、蛍光分子ライブラリーをもとに作製した蛍光性Revペプチドライブラリーを用いた蛍光センサーの構築、触媒分子を有し多様な構造に富んだRNPライブラリーを用いたエステル加水分解活性をもつRNPの構築、モジュール型設計による触媒分子修飾RNPの作製に成功した。これらの成果により、RNPリセプターを構造基盤として、合目的に機能性RNPが作製できることを示した。これらの成果は、生物の情報伝達システムの詳細な解析を可能とするセンサーや、高効率な物質変換を可能とするテララーメード人工酵素を作製するうえでの重要な基盤となる。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、リボヌクレオペプチド (RNP) を基本骨格として作製したリセプターを利用して、ライブラリー法ならびに構造情報を利用した分子設計により、目的とする蛍光応答性や、触媒活性を有する機能性 RNP を簡便に作製する方法論を論じたものである。

合目的な RNP ライブラリーの作製方法、効率的なスクリーニング法、そして構造情報を利用した RNP 分子設計法を開発し、RNP 複合体を利用した機能性分子作製法の拡張性と有用性について論じた結果をまとめており、得られた主な成果は次のとおりである。

1. レシオメトリック型蛍光分子を用いて、RNP リセプターを段階的に機能化することにより、定量性よく標的分子を計測する蛍光 RNP センサーを作製する方法を開発した。

2. 蛍光分子ライブラリーを用いて、蛍光分子で修飾したペプチドライブラリーを作製する手法を新たに開発し、この蛍光ペプチドライブラリーを用いて作製した蛍光 RNP ライブラリーをスクリーニングすることにより、合目的に蛍光 RNP センサーを得る汎用的な方法を確立した。

3. 多様な構造を有する RNP の分子種数を、飛躍的に増大することが可能な RNP ライブラリーの構築法を開発した。この方法によって構築した、多様な構造の RNP に触媒分子を導入した RNP ライブラリーから、エステル加水分解活性を有する RNP を得た。これは、RNP を用いた人工酵素作製の先駆けとなる成果である。

4. モジュール型分子設計によって触媒分子を導入した RNP を作製し、三次元構造情報を利用した RNP リセプターの機能化法を提示した。

以上、本論文では、ライブラリー法と構造情報を活用した分子設計法によって、RNP リセプターに簡便かつ合理的に新たな機能を付与する方法論を新しく開発した。これらの方法によって、定量性が高く基質選択性に優れた蛍光センサーと、標的反応に対して触媒活性を有する RNP 酵素の作製に成功した。これらの成果は、生物の情報伝達系の解析に有用な分子ツールや、生物の優れた物質変換を担う酵素類似機能を有する分子を創製する学術領域に寄与する。

よって、本論文は博士 (エネルギー科学) の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 29 年 2 月 23 日実施した論文内容とそれに関連した試問の結果合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文の全文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 平成 30 年 3 月 31 日以降